

「Treg 細胞療法実現に資する TNFR2 スーパーアゴニストの開発」

神戸学院大学薬学部

角田 慎一

1 研究の背景と目的

Treg 細胞は免疫応答制御・免疫寛容を担うリンパ球であり、Treg 細胞の機能不全は免疫システムの暴走、すなわち種々の免疫疾患の原因になっていることが明らかになってきた。そのため、Treg 細胞を *in vitro* あるいは *in vivo* で量的あるいは機能的に増幅して投与できれば、治療困難であった免疫疾患が治療可能になると期待されている (Treg 細胞療法)。特に昨今、iPS 細胞から Treg 細胞を誘導できること、さらに誘導因子の 1 つとして TNFR2 刺激の重要であることが報告されたことから、そこに iPS 細胞由来 Treg 細胞を効率よく増幅する技術を組合せれば、Treg 細胞療法の実用化を大きく前進させることが可能になると考えられる。これまでに研究代表者らは、Treg 細胞に 2 型 TNF 受容体 (TNFR2) が特異性高く発現し、増殖・活性化に関わることを見出すとともに、独自のタンパク質工学的手法により、TNFR2 選択的なアゴニストとしてはたらくタンパク質 (TNF 機能改変体: R2agoTNF) の創製に成功している。そこで本研究では、Treg 細胞療法実現の鍵となるプラットフォーム技術として、Treg 細胞の効率的な増幅を可能とする TNFR2 スーパーアゴニストの創製を試みた。

2 研究方法・研究内容

本研究では、TNFR2 を標的として制御性 T 細胞 (Treg) を選択的に増幅する TNFR2 スーパーアゴニストの開発を目的とし、分子設計から機能評価、動物モデル、ヒト細胞での検証まで一貫した解析を行った。

① TNFR2 スーパーアゴニストのデザインおよび構造解析

TNFR2 スーパーアゴニストとして、研究代表者らが独自に創出した TNFR2 選択的 TNF- α 変異体 (マウス TNFR2 アゴニスト ; R2agoTNF, Ando D. et al. Biochem Biophys Rep 2016, ヒト TNFR2 アゴニスト R2-7, Abe Y. et al. Biomaterials 2011) を三量体単鎖化構造 (scR2agoTNF, scR2-7) とし、さらにヒト IgG1-Fc 領域を融合して二価構造とした Fc キメラ分子 scR2agoTNF-Fc, scR2-7-Fc を設計した。組換えタンパク質は哺乳類細胞 (Expi293F) を用いて発現させ、クロマトグラフィーにより精製した。次に、表面プラズモン共鳴 (SPR) およびフローサイトメトリー解析により、TNFR2 に対する選択的結合性を評価した。

② TNFR2 スーパーアゴニストの *in vitro* 機能解析

scR2agoTNF-Fc の *in vitro* 機能解析として、マウス由来 T 細胞を用いた CFSE 法により Treg およびコンベンショナル T 細胞の増殖を比較し、Treg 選択的増殖能を検証した。また、Treg とコンベンショナル T 細胞の共培養系を用いて、Treg の免疫抑制機能を評価した。

③ TNFR2 スーパーアゴニストのヒト Treg 細胞での評価

ヒト Treg 細胞への応用可能性を検討するため、ヒト TNFR2 選択的アゴニスト scR2-7-Fc を使用し、ヒト PBMC を用いて Treg 増殖効果を評価した。

3 研究成果

本研究により、以下の成果を得た。

① TNFR2 スーパーアゴニストのデザインおよび構造解析

まず、TNFR2 スーパーアゴニストの分子設計において、TNFR2 選択的 TNF- α 変異体 (R2agoTNF および R2-7) を単鎖三量体化し、さらに IgG-Fc 領域と融合することで、

二価構造を有する新規融合タンパク質 (scR2agoTNF-Fc および scR2-7-Fc) を創製した (図 1)。本分子は、単鎖三量体構造により TNF 様の受容体結合構造を維持しつつ、Fc 融合による二価化により受容体への多価結合を可能とする設計となっている。実際に、サイズ排除クロマトグラフィーおよび Western blot 解析により、想定通りの分子量および均一な分子構造を有することが確認された。また、SPR 解析により、scR2agoTNF-Fc は TNFR2 に対して高い結合親和性を示し、TNFR1 には結合しない高い選択性を維持していることが明らかとなった。特に、Fc 融合体では最大結合応答 (Rmax) の増大および Kd 値の低下が認められ、単量体型分子と比較して結合アビディティが向上していることが示された。さらに、フローサイトメトリー解析の結果、本分子は野生型 Treg には結合する一方、TNFR2 欠損 Treg には結合しないことが確認され、細胞レベルにおいても TNFR2 依存的な結合特性を有することが示された (図 2)。これらの結果から、scR2agoTNF-Fc が TNFR2 選択的な結合性を保持し、Fc 融合による二価構造化は TNFR2 クラスター形成を促進し、シグナル伝達効率を高める設計として有効であることが示された。

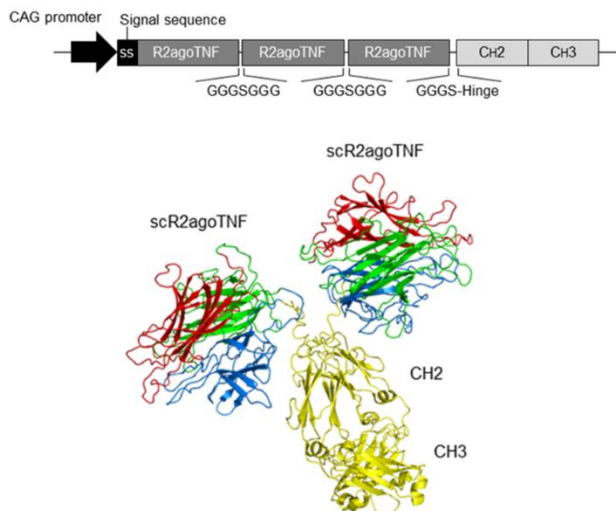


図 1 TNFR2 スーパーアゴニストの分子設計

TNFR2 選択的 TNF- α 変異体 (R2agoTNF) を単鎖三量体化し、さらにヒト IgG1-Fc 領域と融合することで二価構造を有する TNFR2 スーパーアゴニスト (scR2agoTNF-Fc) を設計した。Fc 融合によりリガンドの多価性が付与され、TNFR2 クラスター形成を介したシグナル増強が期待される。

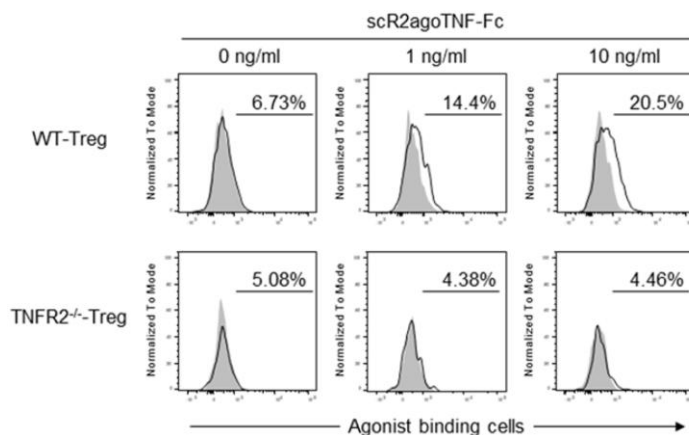


図 2 TNFR2 スーパーアゴニストの TNFR2 選択性

TNFR2 野生型マウス由来 CD4⁺CD25⁺ Treg 及び TNFR2 遺伝子ノックアウトマウス由来 Treg に対する scR2agoTNF の結合性をフローサイトメトリーで解析した。TNFR2 野生型 Treg にのみ結合性が認められた。

② TNFR2 スーパーアゴニストの in vitro 機能解析

in vitro における機能解析として、マウス由来 T 細胞を用いた検討を行った。CFSE 希釈法による解析の結果、scR2agoTNF-Fc は Treg (CD4⁺CD25⁺あるいは Foxp3⁺細胞) の増

殖を顕著に促進することが確認された。一方で、コンベンショナル T 細胞 (CD4⁺CD25⁻) や CD8⁺T 細胞に対する増殖促進効果は限定的であり、本分子が Treg を選択的に増幅する特性を有することが明確に示された。さらに、混合培養系においても、Treg のみが優先的に増殖することが確認され、実際の免疫環境に近い条件下でも Treg 選択性が維持されることが示された。

作用機序の解析においては、TNFR2 刺激により NF- κ B シグナルが活性化されることが確認され、特に Treg においてはシグナルの持続性が高いことが示唆された。これは、TNFR2 が Treg に高発現していることと整合しており、Treg 特異的な増殖・活性化の分子基盤を支持する結果と考えられる。

さらに、*in vitro* 機能評価として Treg とコンベンショナル T 細胞の共培養系を用いた抑制試験を行った結果、scR2agoTNF-Fc により活性化された Treg は、コンベンショナル T 細胞の増殖を有意に抑制することが確認された。すなわち、本分子は Treg の数を増加させるだけでなく、免疫抑制機能を有する「機能的 Treg」を増幅させることが可能であることが明らかとなった。(図 3)

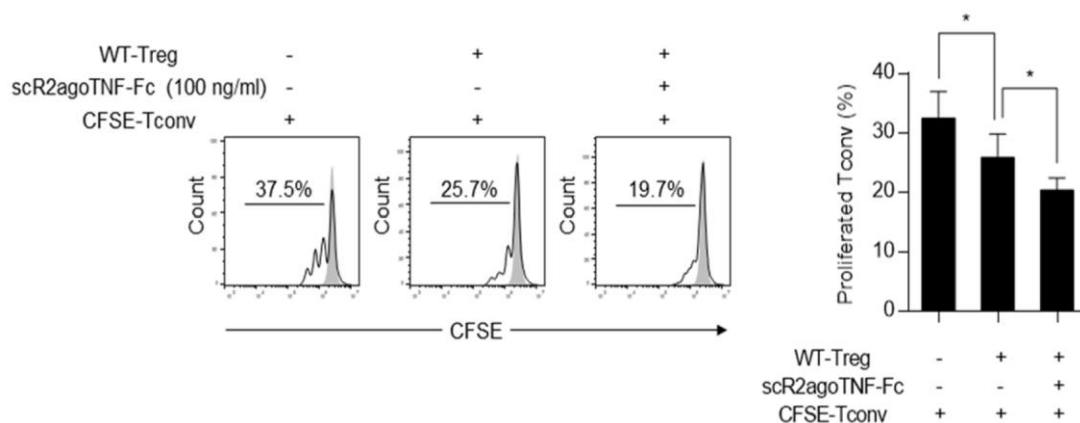


図 3 増幅 Treg の免疫抑制機能

scR2agoTNF-Fc により増幅した Treg の機能を、Treg と CFSE 標識コンベンショナル T 細胞 (Tconv) の共培養系により評価した。増幅 Treg は Tconv の増殖を有意に抑制し、免疫抑制機能が維持・強化されていることが確認された。また、この効果は TNFR2 依存的であることが示された。

③ TNFR2 スーパーアゴニストのヒト Treg 細胞での評価

さらに、ヒトへの応用可能性を検討するため、ヒト TNFR2 選択的スーパーアゴニストである scR2-7-Fc を用いて、ヒト PBMC に対する作用を評価した。ヒト CD4⁺Foxp3⁺ Treg は TNFR2 を高発現しており、他の T 細胞集団と比較して TNFR2 依存的な応答性が高いことが確認された。scR2-7-Fc を添加した培養条件下では、ヒト Treg の割合および増殖が有意に増加し、ドナー間で一定の再現性をもって Treg 選択的増幅作用が認められた。これに対し、非 Fc キメラ型分子では十分な増殖誘導効果が得られないことから、Fc 融合による多価化がヒト系においても重要であることが示された。すなわち、本研究で開発した TNFR2 スーパーアゴニストは、マウスのみならずヒト T 細胞においても Treg を選択的に増幅する能力を有することが明らかとなり、ヒト Treg 細胞移入療法への応用の可能性が示された (図 4)。

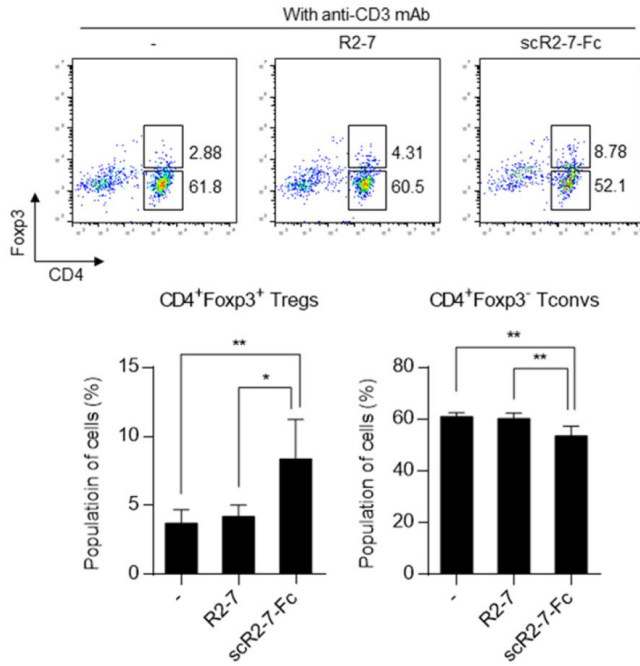


図4 scR2-7-FcによるヒトTregの選択的増幅

ヒト末梢血単核球 (PBMC) を用いて、ヒト TNFR2 選択的スーパーアゴニスト scR2-7-Fc の効果を評価した。ヒト CD4⁺Foxp3⁺ Treg は TNFR2 を高発現しており、scR2-7-Fc 刺激により Treg の割合および増殖が有意に増加した。これにより、ヒト Treg においても TNFR2 スーパーアゴニストによる選択的増幅が可能であることが示された。

以上の結果より、本研究で創製した TNFR2 スーパーアゴニスト (scR2agoTNF-Fc 及び scR2-7-Fc) は、(1) TNFR2 に対する高い選択性と結合アビディティ、(2) Treg 選択的な増殖誘導、(3) 免疫抑制機能を有する Treg の拡大、(4) scR2-7-Fc においてはヒト Treg の増幅誘導能、を備えた分子であることが明らかとなった。本成果は、Treg 細胞療法における細胞増幅技術として極めて有用であり、特に iPS 細胞由来 Treg 細胞の効率的増幅および機能強化に応用可能なプラットフォーム技術として位置づけられる。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で創製した TNFR2 スーパーアゴニストは、Treg 細胞療法の実用化を加速するプラットフォーム技術として有用である。Treg 細胞を選択的かつ効率的に増幅することができれば、Treg 細胞移入による、自己免疫疾患、アレルギー疾患、移植医療における拒絶反応や GVHD など、難治性免疫疾患に対する新規治療法 (Treg 移入療法) の実現に向けて大きく前進するものと考えられる。特に、iPS 細胞由来 Treg 細胞の誘導技術と組み合わせることで、Treg 細胞の大量製造および機能強化が可能となり、再生医療等製品としての産業化に直結することが期待される。